

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-034598

(43)Date of publication of application : 05.02.2002

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 9/22

C12N 15/09

(21)Application number : 2000-226912

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 27.07.2000

(72)Inventor : YOSHIGA SATOKO
TAKARADA YUTAKA
AONO TOSHIYA
SEGAWA MASAYA

(54) METHOD FOR DETECTING BASE POLYMORPHISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To readily detect the kind of a base polymorphism contained in a specimen.**SOLUTION:** In this method for detecting a base polymorphism by treating a base polymorphism sequence part contained in a specific nucleic acid sequence existing in a specimen with two or more probes specific to the base polymorphism sequence part and obtaining the ratio of detection signals obtained from each probe, the method for detecting the base polymorphism is characterized in that a part to be hybridized with at least polymorphism sequences of the probes specific to the base polymorphism part is an RNA.

レ	ン	サン	ナル
1	・	・	・
2	・	・	・
3	・	・	・
4	・	・	・
5	・	・	・
6	・	・	・
7	・	・	・

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-34598

(P2002-34598A)

(43) 公開日 平成14年2月5日(2002.2.5)

(51)Int.Cl.	識別記号	FI	7-コード (参考)
C12Q 1/68		C12Q 1/68	A 4B024
C12N 9/22		C12N 9/22	4B050
15/09	ZNA	15/00	ZNA A 4B063

審査請求 未請求 請求項の数18 OL (全 10頁)

(21) 出願番号 特願2000-226912(P 2000-226912)

(22) 出願日 平成12年7月 27日(2000.7.27)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 吉賀 聡子

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】塩基多型を検出する方法

(57) 【要約】

【課題】試料中に含まれる塩基多型の種類を容易に検出する。

【解決手段】試料中に存在する特定の核酸配列に含まれる塩基多型配列部分に特異的な2種以上のプローブを作製させ、各々のプローブにより得られる検出シグナルの比を求めることにより塩基多型を検出する方法において、多型配列部分に特異的なプローブの少なくとも多型配列とハイブリダイズする部分がRNAであることを特徴とする塩基多型を検出する方法。

レーン	サンプル
1	マート(Φ1174/BaeIII TOYOBO)
2	Aプローブ: RNaseA 処理
3	Aプローブ: アルカリ処理
4	Aプローブ: 処理なし
5	Gプローブ: RNaseA 処理
6	Gプローブ: アルカリ処理
7	Gプローブ: 処理なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中に存在する特定の核酸配列に含まれる塩基多型配列部分に特異的な2種以上のプローブを作用させ、各々のプローブにより得られる検出シグナルの比を求めることにより塩基多型を検出する方法において、多型配列部分に特異的なプローブの少なくとも多型配列とハイブリダイズする部分がRNAであることを特徴とする塩基多型を検出する方法。

【請求項2】該核酸配列中に含まれる多型配列部分に特異的な2種以上のプローブを作用させ塩基多型を検出する方法において、RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼ処理を行うことを特徴とする請求項1記載の塩基多型を検出する方法。

【請求項3】RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼが、リボヌクレアーゼAまたはリボヌクレアーゼA類似酵素である請求項2記載の方法。

【請求項4】 試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列の塩基多型を検出する方法において、予め該核酸配列を増幅させる請求項1記載の方法。

【請求項5】 PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法により該核酸配列を増幅させる請求項4記載の方法。

【請求項6】 塩基多型が1塩基多型、挿入、欠失多型のいずれかを含む請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列の塩基多型を同定する方法であって、(1)該特定核酸配列の塩基多型を含む核酸断片を増幅し、(2)増幅された核酸と2種以上の多型特異的プローブとハイブリダイズさせ、(3)RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼで処理し、(4)各々のプローブの検出シグナルを測定し、(5)各検出シグナルの比により多型配列を同定することを特徴とする方法。

【請求項8】 PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法に該核酸配列を増幅させる請求項7記載の方法。

【請求項9】 塩基多型が1塩基多型、挿入、欠失多型のいずれかを含む請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】 試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列の塩基多型を同定する方法であって、(1)該特定核酸配列の塩基多型を含む核酸配列を標識したプライマーを用いて増幅し、(2)増幅核酸と各々異なる多型特異プローブとハイブリダイズさせ、(3)RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼで処理し、(4)各々のプローブとハイブリダイズしたか否かを該プライマーの標識により検出し、(5)各検出シグナルの比により多型配列を同定することを特徴とする方法。

【請求項11】 PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれ

かの方法に該核酸配列を増幅させる請求項10記載の方法。

【請求項12】 塩基多型が1塩基多型、挿入、欠失多型のいずれかを含む請求項11または12に記載の方法。

【請求項13】 プライマーの標識がビオチン、ジコキシゲニン、蛍光物質、発光団および酵素よりなる群から選ばれたいずれかである請求項10～12のいずれかに記載の方法。

10 【請求項14】 試料中に含まれる1塩基多型を含む特定の核酸配列の1塩基多型を同定する方法であって、(1)該特定核酸配列の1塩基多型を含む核酸断片を標識したプライマーを用いて増幅し、(2)増幅核酸と2個以上の固相の各々に固定した野生型プローブと変異型プローブとハイブリダイズさせ、(3)RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼで処理し、(4)各々のプローブとハイブリダイズしたか否かを該プライマーの標識により検出し、(5)野生型プローブの検出シグナルと変異型プローブの検出シグナルの比により該1塩基多型が野生型、変異型もしくは混合型のいずれかを同定する、ことを特徴とする方法。

20 【請求項15】 PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法に該核酸配列を増幅させるである請求項14記載の方法。

【請求項16】 プライマーの標識がビオチン、ジコキシゲニン、蛍光物質、発光団および酵素よりなる群から選ばれたいずれかである請求項14または15に記載の方法。

30 【請求項17】 塩基多型部分にハイブリダイズし得るヌクレオチドがRNAである野生型用プローブおよび少なくとも1種の変異型用プローブ、並びにRNA選択的開裂エンドヌクレアーゼを含む塩基多型検出用キット【請求項18】さらに、少なくとも一方が標識され、かつ、塩基多型部位を含む核酸配列を増幅するためのフォワードプライマー及びリバースプライマーのセットを含む、請求項17に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40 【発明の属する技術分野】本発明は、核酸配列の分析法に関する。さらに詳しくは、特定の核酸配列中に含まれる塩基多型を検出することができる核酸配列分析法に関する。本発明の核酸配列分析法は、遺伝子工学や分子生物学及びこれらに関連する産業分野において有用である。

【0002】

【従来の技術】本発明において、塩基多型とは野生型とは異なる配列を有する遺伝子型であって、多型遺伝子は薬物代謝において、並びに副作用および治療失敗の発生
50 において個体間変動の原因として重要な役割を果たして

いる。また体質として知られる基礎代謝等の個人差の原因としても知られている。その上、これらは多数の疾患の遺伝マーカーとしての働きもする。それゆえ、これら突然変異の解明は臨床的に重要であり、ルーチンの表現型分類が臨床研究における精神医学患者および自発志願者にとって特に推奨される(GranおよびBrssen, European Consensus Conference on Pharmacogenetics, Commission of the European Communities, Luxembourg, 1990, pp87-96; Balantら, Eur. J. Clin. Pharmacol. 36, 551-554, 1989)。それゆえ、原因となる多型遺伝子の同定に続くそれぞれの遺伝子型の検出用の核酸配列分析法が所望される。

【0003】従来の核酸配列分析技術としては、例えば核酸配列決定法(シーケンシング法)がある。核酸配列決定法は核酸配列中に含まれる塩基多型を検出、同定することができるが、鋳型核酸の調製、ポリメラーゼ反応、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、核酸配列の解析等を行うため多大な労力と時間が必要である。また近年の自動シーケンサーを用いることで省力化は行うことができるが、高価な装置が必要であるという問題がある。

【0004】他の方法として、サザンハイブリダイゼーション法がある(村松正實編「ラボマニュアル遺伝子工学 増補版」丸善株式会社発行、第70~75頁)。この方法によれば、標識されたDNAプローブと相補的な塩基配列を持つDNAの領域を同定することができる。即ち、サザンハイブリダイゼーション法では、核酸断片をアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルの平板上で電気泳動させ、断片の大きさ(長さ)によって分離した後、変性させて一本鎖とし、その平板にニトロセルロースやナイロン等のメンブランを張り付け、核酸断片を電気泳動パターンそのままにトランスファーし、固定した後、RI(放射性同位体)等で標識した塩基多型特異的DNAプローブとハイブリッドを形成させ、プローブに相補的なメンブラン上の核酸断片をオートラジオグラフィ等により検出する。

【0005】サザンハイブリダイゼーション法によれば、目的とするDNA断片の電気泳動位置や分子量を決めることができるが、電気泳動やオートラジオグラフィ等の操作に長時間を要し、迅速に分析を行うことができないこと、塩基多型特異的DNAプローブとハイブリダイゼーションしたか否かだけで検出するため、プローブの特異性を厳密にしないと、塩基多型の有無を検出するための類似配列を識別することが困難である等の問題があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列中に塩基多型の種類を容易に検出できる核酸配列分析法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、相補的な核酸ハイブリッド形成における相互作用に着目し、目的とする核酸断片に相補的な塩基配列を持つ核酸をプローブとし、相補的な核酸の示す特異的な相互作用を利用することによって、目的とする核酸断片の配列を分析できることを見出した。

【0008】ここで、一般に厳密に配列、温度を規定しても完全に相補的なプローブだけが反応し、ミスマッチを含むプローブが反応することを防ぐことはできないことが知られている。その為ミスマッチプローブでその遺伝子型を決定する場合温度や配列を規定しても検出シグナルの有無によっては明確に野生型、変異型、混合型を区別することが困難である。

【0009】そこで、本発明者らは、核酸配列分析法の開発研究を進める過程で、多型配列とハイブリダイズする部分がRNAである多型配列部分に特異的なプローブを用い、ハイブリダイズ後もしくは同時にRNA選択的開裂エンドヌクレアーゼ処理を行うことで多型配列部分が相補的でない組み合わせにおいて起こる非特異的な結合を減少させることが可能であることを見出し、当発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

【0011】(1) 試料中に存在する特定の核酸配列に含まれる塩基多型配列部分に特異的な2種以上のプローブを作用させ、各々のプローブにより得られる検出シグナルの比を求めることにより塩基多型を検出する方法において、多型配列部分に特異的なプローブの少なくとも多型配列とハイブリダイズする部分がRNAであることを特徴とする塩基多型を検出する方法。

【0012】(2) 該核酸配列中に含まれる多型配列部分に特異的な2種以上のプローブを作用させ塩基多型を検出する方法において、RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼ処理を行うことを特徴とする請求項1記載の塩基多型を検出する方法。

【0013】(3) RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼが、リボヌクレアーゼAまたはリボヌクレアーゼA類似酵素である(2)の方法。

40 【0014】(4) 試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列の塩基多型を検出する方法において、予め該核酸配列を増幅させる(1)の方法。

【0015】(5) PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法に該核酸配列を増幅させる(4)の方法。

【0016】(6) 塩基多型が1塩基多型、挿入、欠失多型のいずれかを含む(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

50 【0017】(7) 試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列の塩基多型を同定する方法であって、

(1) 該特定核酸配列の塩基多型を含む核酸断片を増幅し、(2) 増幅された核酸と2種以上の多型特異的プローブとハイブリダイズさせ、(3) RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼで処理し、(4) 各々のプローブの検出シグナルを測定し、(5) 各検出シグナルの比により多型配列を同定する、ことを特徴とする方法。

【0018】(8) PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法に該核酸配列を増幅させる(7)の方法。

【0019】(9) 塩基多型が1塩基多型、挿入、欠失多型のいずれかを含む(7)または(8)に記載の方法。

【0020】(10) 試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列の塩基多型を同定する方法であって、(1) 該特定核酸配列の塩基多型を含む核酸配列を標識したプライマーを用いて増幅し、(2) 増幅核酸と各々異なる多型特異プローブとハイブリダイズさせ、(3) RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼで処理し、(4) 各々のプローブとハイブリダイズしたか否かを該プライマーの標識により検出し、(5) 各検出シグナルの比により多型配列を同定する、ことを特徴とする方法。

【0021】(11) PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法に該核酸配列を増幅させる(10)の方法。

【0022】(12) 塩基多型が1塩基多型、挿入、欠失多型のいずれかを含む(11)または(12)に記載の方法。

【0023】(13) プライマーの標識がビオチン、ジコキシゲニン、蛍光物質、発光団および酵素よりなる群から選ばれたいずれかである(10)から(12)のいずれかに記載の方法。

【0024】(14) 試料中に含まれる1塩基多型を含む特定の核酸配列の1塩基多型を同定する方法であって、(1) 該特定核酸配列の1塩基多型を含む核酸断片を標識したプライマーを用いて増幅し、(2) 増幅核酸と2個以上の固相の各々に固定した野生型プローブと変異型プローブとハイブリダイズさせ、(3) RNA選択的開裂エンドヌクレアーゼで処理し、(4) 各々のプローブとハイブリダイズしたか否かを該プライマーの標識により検出し、(5) 野生型プローブの検出シグナルと変異型プローブの検出シグナルの比により該1塩基多型が野生型、変異型もしくは混合型のいずれかを同定する、ことを特徴とする方法。

【0025】(15) PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAよりなる群から選ばれたいずれかの方法に該核酸配列を増幅させる(14)の方法。

【0026】(16) プライマーの標識がビオチン、ジコキシゲニン、蛍光物質、発光団および酵素よりなる

群から選ばれたいずれかである(14)または(15)に記載の方法。

【0027】(17) 塩基多型部分にハイブリダイズし得るヌクレオチドがRNAである野生型用プローブおよび少なくとも1種の変異型用プローブ、並びにRNA選択的開裂エンドヌクレアーゼを含む塩基多型検出用キット(18) さらに、少なくとも一方が標識され、かつ、塩基多型部位を含む核酸配列を増幅するためのフォワードプライマー及びリバースプライマーのセットを含む、(17)に記載のキット。

【0028】

【発明の実施の形態】本発明における方法は、試料中に存在する特定の核酸配列に含まれる塩基多型配列部分に特異的な野生型及び変異型に対応する2種以上のプローブを作用させ、各々のプローブにより得られる検出シグナルの比を求める方法において、各プローブにおいて少なくとも多型配列とハイブリダイズする部位をRNAとし、好ましくはRNA選択的開裂エンドヌクレアーゼ処理を行うことで、多型配列部位でハイブリダイズしないRNAを除去し、RNAが除去されたか否かを検出することで、多型配列部位が野生型(ホモ)、混合型(野生型/変異型)、変異型(ホモ)のいずれであるのかを検出することを特徴とするものである。

【0029】ここでRNA選択的開裂エンドヌクレアーゼとしては、リボヌクレアーゼAまたはリボヌクレアーゼA類似酵素などが挙げられる。また塩基多型としては、1塩基多型、挿入、欠失多型などの態様が挙げられる。

【0030】試料中に存在する特定の核酸配列は、目的の遺伝子の情報を担う塩基多型を含む核酸配列であれば、特に制限されない。該標的核酸配列の例としては、Alu配列、蛋白質をコードする遺伝子のエキソンやイントロン、プロモーターなどが例示できる。より具体的には、遺伝病を含む各種疾患、薬物代謝、生活習慣病(高血圧、糖尿病等)に関連する遺伝子が挙げられる。例えば、高血圧としてACE (Angiotensin I Converting Enzyme)遺伝子が挙げられる。

【0031】本発明において、核酸配列を単に核酸ということがある。変異型核酸配列とは、野生型核酸配列のうち少なくとも1つ、好ましくは1つのヌクレオチドが点突然変異して他のヌクレオチドに置換されているものや、野生型核酸の一部に挿入、欠失配列等を含む核酸のことであり、どの部位のヌクレオチドが変異しているかが解明されているものである。このような塩基多型により体質等が異なっていることが解明されてきており、本発明の方法は試料中の核酸がこのような予想される変異を有しているか否かを検査する方法である。

【0032】本発明で使用する野生型プローブ及び少なくとも1種の変異型プローブは、いずれもRNAからなる塩基多型部位を含み、より好ましくは塩基多型部位

の前後1塩基以上が同じRNAであるものがよい。本発明の野生型ないし変異型核酸にハイブリダイズし得るプローブは、好ましくは連続した少なくとも15塩基、より好ましくは連続した少なくとも18塩基からなる塩基配列である。プローブとしては、例えば15~35塩基、特に18~30塩基のものが挙げられる。プローブは多型配列とハイブリダイズする部分をRNAとする以外は特定核酸配列と相補鎖を形成すればDNAでもRNAでもPNAでもよく、化学合成または生物学的な方法により調製することができる。例えば、パーキンエルマー社のDNAシンセサイザー391型を用いてホスホアミダイト法により合成できる。精製はFPLCでMONO-Qカラムや逆相カラムにて実施しても良い。他の合成方法としてリン酸トリエステル法、ホスホネート法、チオホスファイト法等がある。

【0033】プローブ中の多型配列の位置は、特に限定されない、5'末端又は3'末端以外の位置が好ましく、5'末端ないし3'末端から2塩基以上、好ましくは3塩基以上、より好ましくは5塩基以上離れているのがよい。

【0034】また、合成時にビオチン、リンカーアーム、蛍光物質等を有するヌクレオチドまたはオリゴdGTP、オリゴdATP、オリゴdTTP、オリゴdCTP等を5'末端または3'末端に付加し修飾基を導入しても良い。あるいはビオチン、リンカーアーム、蛍光物質等を有するヌクレオチドをオリゴヌクレオチド配列中のヌクレオチドの替わりに置換して合成し修飾基を導入しても良い。あるいは合成したヌクレオチドに後から³²P、³⁵Sなどの放射性物質、ALF、POIなどの酵素、FITC、HE)、6-FAM、TEなどの蛍光物質などを、公知のオリゴヌクレオチドの標識物を導入しても良い。これらの標識は、プローブだけでなく、標的核酸を増幅するためのフォワードプライマー、リバースプライマーにも同様に導入することができる。また本発明において、プローブで検出する前に、予め試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列を増幅させておいてもよい。

【0035】核酸配列の増幅法としては特に限定されるものではないが、PCR(Polymerase chain reaction; 特公平4-67960号公報、特公平4-67957号公報)、NASBA(Nucleic acid sequence-based amplification method; Nature 第350巻、第91頁(1991))、LCR(WO089/1269、特開平2-2934号など)、SDA(Strand Displacement Amplification; Nucleic Acids Res. 第20巻、第1691頁(1992))、RCR(WO90/01069)、TMA(Transcription Mediated amplification Method; J.Clin.Microbiol. 第31巻、第3270頁(1993))などが挙げられ、いずれにおいても適用することが可能である。具体的には、例えば、ビオチン等で標識したプライマー(フォワードプライマー及びリバースプライマー)を用いて特定

核酸配列を増幅した後、増幅核酸を1本鎖にし、例えば、マイクロタイタープレートのような固相に結合させた野生型及び変異型の多型特異的プローブとハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしなかった核酸を洗いだし、プローブとハイブリダイズした核酸のプライマーの標識によりハイブリダイズしたか否かを検出し、各プローブの検出シグナルの比により塩基多型が野生型か変異型もしくは混合型であるのかを同定する方法が挙げられる。

【0036】野生型の特異的プローブ及び変異型の特異的プローブは、いずれも多型配列部分を含むものであればよいが、好ましくは5塩基以上、より好ましくは10塩基以上、さらに好ましくは15塩基以上の共通して標的核酸にハイブリダイズする配列を有する。

【0037】 キット

本発明において、キットとしては、野生型用プローブ及び1種又は2種の変異型用プローブ、RNAエンドスクレアーゼを含む塩基多型検出用試薬キットを含むものであり、該各プローブの塩基多型部位の予想されるヌクレオチドはRNAからなる。該キットには、必要に応じて、標的核酸配列を増幅するためのフォワードプライマー、リバースプライマーが含まれ、これらのプライマーは好ましくは標識されている。

【0038】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。なお、本発明は実施例により特に限定されるものではない。

実施例1 ヒトβ2アドレナリン作動性受容体(ADRB2)遺伝検出用特異的プローブのRNaseAによる分解

(1)リンカーアームを有するオリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号3に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(Aプローブ)および配列番号4に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(Gプローブ)を合成した。Aプローブ(配列番号3)およびGプローブ(配列番号4)を以下に示す。

Aプローブ(配列番号3; 24塩基): TTTTTCACCCA AT
AGAAGCCA T(下線を付した5'末端から13番目の
"A"(1塩基多型部位)とその前後のT及びGがRNA
Aであり、他は全てDNAである。

Gプローブ(配列番号4; 23塩基): TTTTTCACCCA AT
GAAGCCA T(下線を付した5'末端から14番目(1
塩基多型部位)の"G"とその前後のT及びGがRNA
であり、他は全てDNAである。

【0039】この際、特表昭60-500717号公報に開示された合成法により、デオキシウリジンから化学合成により調製した、5位にリンカーアームを有するウリジンを上記オリゴヌクレオチドに導入した。合成され

たリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50℃、一夜脱保護処理を施した後、パーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

(2) RNaseAによる多型配列特異的プローブの切断

ADRB2検出用特異的プローブ 500pmolにリボヌクレアーゼI(A) (ファルマシア製)を加えて、37℃で20分間反応し、RNaseA部位を分解させた。

【0040】次に、処理後のサンプルを10%ポリアリルアミドゲルにアプライし20mM、120Vで30分間電気泳動を行った。泳動後サイバークリーン II(アマシャム)で30分間染色しポラロイド(登録商標)フィルムにて写真撮影した。

【0041】対照として、同様のプローブ 500 pmolを直接ゲルにアプライしたもの、アルカリ処理を行ったものを加えた。

(3) ヒトADRB2遺伝子検出用特異的プローブのRNaseAによる分解検討結果

上記(2)にて検出されたヒトADRB2遺伝子検出用特異的プローブのRNaseAによる分解検討結果を図1に示す。

【0042】図1から分かるように、多型配列とハイブリダイズする部分がRNAであるプローブはRNA部分でRNaseAによって分解され、予想する短い断片として検出された。

実施例2 ヒトβ2アドレナリン作動性受容体(ADRB2)遺伝子の塩基多型検出

(1) ADRB2遺伝子断片増幅用プライマーの合成
パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号1に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー1)および配列番号2に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー2)を合成した。プライマー1は、ヒトADRB2遺伝子配列と相同な配列を有し、プライマー2はヒトADRB2遺伝子配列と相補な配列を有し、かつ、5'側にピオチンを連結している。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

(2) リンカーアームを有するオリゴヌクレオチドの合成
パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号3に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(Aプローブ)および配列番号4に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(Gプローブ)を合成した。

【0043】この際、特表昭60-500717号公報に開示された合成法により、デオキシウリジンから化学合成により調製した、5位にリンカーアームを有するウ

リジンを上記オリゴヌクレオチドに導入した。合成されたリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50℃、一夜脱保護処理を施した後、パーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

(3) プローブオリゴヌクレオチドのマイクロタイタープレートへの結合

上記(2)で合成したプローブオリゴヌクレオチドについて、そのリンカーアームを介して、マイクロタイタープレート内面へ結合した。オリゴヌクレオチドを50mM 10 M 硼酸緩衝液(pH10)、100mM MgCl₂の溶液に0.05pmol/μlになるように希釈し、マイクロタイタープレート(MicroFLUOR E、ダイナテック社)に各100μlずつ分注し、15時間程度室温に放置することで、リンカーオリゴヌクレオチドをマイクロタイタープレート内面に結合させた。その後、0.1pmol dNTP、0.5%PVP(ポリビニルピロリドン)、5×SSCに置換して、非特異反応を抑えるためのブロッキングを室温で2時間程度行った。最後に1×SSCで洗浄して乾燥させた。

20 (4) PCR法によるヒトADRB2遺伝子断片の増幅
ヒト白血球より抽出したDNA溶液をサンプルとして使用して、下記試薬を添加して、下記条件によりヒトADRB2遺伝子断片を増幅した。試薬:以下の試薬を含む25μl溶液を調製した。

【0044】

プライマー1 5pmol

プライマー2 5pmol

×10緩衝液 2.5μl

2mM dNTP 2.5μl

30 KODplus DNAポリメラーゼ 0.2U

抽出DNA溶液 100ng

増幅条件

94℃・5分

94℃・15秒、60℃・30秒、68℃、30秒(35サイクル)

68℃・2分

(5) マイクロタイタープレート中でのハイブリダイゼーション

(4)の増幅反応液を10倍に希釈し、0.3N Na

40 OH中で増幅反応液中の増幅された核酸を変性させ、各サンプルごとに増幅反応液20μlを200mMクエン酸-リン酸緩衝液(pH6.0)、2%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、750mM NaCl、0.1% NaN₃の溶液100μlに加えて、上記(3)の捕捉プローブが結合したマイクロタイタープレートに投入した。蒸発を防ぐため流動パラフィンを重ねし、37℃で30分間振盪させた。これによって、増幅されたヒトADRB2遺伝子断片が固定化されたプローブによって特異的にマイクロタイタープレートに捕捉される。

50 【0045】次に、2×SSC(pH7.0)に置換し

た後、各ウエルにRNaseA(25若しくは50 μ g)を添加し、37°Cで20分間加温させた。続いて2 \times SSC(pH7.0)、1%SDS、25%ホルムアルデヒドに置換し同様に蒸発を防ぐため、流動パラフィンを重ねし、37°Cで20分間振盪させた。更にその後、アルカリホスファターゼを標識したストレプトアビジン(DAKO製:D0396)を50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、1%BSAの溶液で2000倍に希釈した溶液100 μ lと置換し、37°Cで15分間振盪させた。これによって、捕捉されたDNAのビオチンにアルカリ性ホスファターゼ標識したストレプトアビジンが特異的に結合した。250 μ lの50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、0.025% Tween20溶液で3回洗浄後、アルカリ性ホスファターゼの発光基質であるジオキセタン化合物(商品名: Lumiphos480; Lumigen社)50 μ lを注入し、37°Cで15分間保温後に暗室中でホトンカウンター(浜松ホトニクス社)で発光量を測定した。

(6)ヒトADRB2遺伝子の塩基多型検出

上記(4)にて増幅し、(5)にて検出されたヒトADRB2遺伝子の塩基多型検出結果を表1に示す。数値は発光量(cps: count/second)で表示される。A signalはAプローブと反応した増幅核酸断片の検出シグナルを、G signalはGプローブと反応した核酸断片の検出シグナルを示す。表1から分かるように各プローブで得られたシグナルの比の対数をとることによりADRB2遺伝子の1塩基多型が同定できる。すなわち、図2より明らかのように、シグナルの比の対数が1.0以上ではA塩基型のホモ遺伝子型、-1.0以下はG塩基型のホモ遺伝子型、-1.0~1.0の間がA塩基型とG塩基型のヘテロ遺伝子型と同定でき、特にAプローブを作用させた場合の非特異反応により生じるノイズ値の低下が認められ、非特異反応が出現しやすいプローブでのノイズ値の改善が期待できる結果であった。

【0046】

【表1】

サンプル名	A signal	G signal	log(A/G)	RNase A
A ホモ	18919	10807	0.24	0 μ g
G ホモ	5790	9072	-0.20	
ヘテロ	14476	13116	0.04	
N	62	87	-0.15	
A ホモ	4904	162	1.48	25 μ g
G ホモ	49	3893	-1.90	
ヘテロ	5204	3544	0.17	
N	49	49	0.00	
A ホモ	6701	162	1.62	50 μ g
G ホモ	74	5318	-1.86	
ヘテロ	5903	4580	0.11	
N	74	49	0.18	

【0047】実施例3 ヒト β 3アドレナリン作動性受容体(3AR)遺伝子の塩基多型検出

(1)3AR遺伝子断片増幅用プライマーの合成

パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号5に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー1)および配列番号6に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー2)を合成した。プライマー2は5'側にビオチンを連結している。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55°C、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

(2)リンカーアームを有するオリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号7に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(Tプローブ)および配列番号8に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(Cプローブ)を合成した。

【0048】この際、特表昭60-500717号公報

に開示された合成法により、デオキシウリジンから化学

30 合成により調製した、5位にリンカーアームを有するウリジンを上記オリゴヌクレオチドに導入した。合成されたリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50°C、一夜脱保護処理を施した後、パーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

(3)プローブオリゴヌクレオチドのマイクロタイタープレートへの結合

上記(2)で合成したプローブオリゴヌクレオチドについて、そのリンカーアームを介して、マイクロタイタープレート内面へ結合した。オリゴヌクレオチドを50m

40 M 硼酸緩衝液(pH10)、100mM MgCl₂の溶液に0.05pmol/ μ lになるように希釈し、マイクロタイタープレート(MicroFLUOR E、ダイナテック社)に各100 μ lずつ分注し、15時間程度室温に放置することで、リンカーオリゴヌクレオチドをマイクロタイタープレート内面に結合させた。その後、0.1pmol dNTP、0.5%PVP(ポリビニルピロリドン)、5 \times SSCに置換して、非特異反応を抑えるためのブロッキングを室温で2時間程度行った。最後に1 \times SSCで洗浄して乾燥させた。

50 (4)PCR法によるヒト3AR遺伝子断片の増幅

ヒト白血球より抽出したDNA溶液をサンプルとして使用して、下記試薬を添加して、下記条件によりヒト3A R遺伝子断片を増幅した。試薬：以下の試薬を含む25 μ l 溶液を調製した。

【0049】

プライマー1 5pmol
 プライマー2 5pmol
 $\times 10$ 緩衝液 2.5 μ l
 2mM dNTP 2.5 μ l
 KODplus DNAポリメラーゼ 0.2U
 抽出DNA溶液 100ng
 増幅条件
 94°C・5分
 94°C・15秒、60°C・30秒、68°C・30秒(3
 5サイクル)
 68°C・2分
 (5)マイクロタイタープレート中でのハイブリダイゼーション

(4)の増幅反応液を10倍に希釈し、0.3N Na OH中で増幅反応液中の増幅されたDNAを変性させ、各サンプルごとに増幅反応液20 μ lを200mMクエン酸-リン酸緩衝液(pH6.0)、2%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、750mM NaCl、0.1%NaN₃、35%ホルムアミドの溶液100 μ lに加えて、上記(3)の捕捉プローブが結合したマイクロタイタープレートに投入した。蒸発を防ぐためプレートシールで被覆し、37°Cで30分間加温させた。これによって、増幅されたヒト3AR遺伝子断片が固定化されたプローブによって特異的にマイクロタイタープレートに捕捉される。

【0050】次に、2 \times SSC(pH7.0)に置換した後、各ウェルにRNaseA(50 μ g)を添加し、37°Cで20分間加温させた。続いて2 \times SSC(pH7.0)、1%SDS、35%ホルムアミドに置換し同様に蒸発を防ぐため、流動パラフィンを重ねし、37°Cで20分間振盪させた。更にその後、アルカリホスファターゼを標識したストレプトアビジン(DAKO製 0396)を50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、

1%BSAの溶液で2000倍に希釈した溶液100 μ lと置換し、37°Cで15分間振盪させた。これによって、捕捉されたDNAのビオチンにアルカリ性ホスファターゼ標識したストレプトアビジンが特異的に結合した。250 μ lの50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、0.025% Tween20溶液で3回洗浄後、アルカリ性ホスファターゼの発光基質であるジオキセタン化合物(商品名: Lumiphos480; Lumigen社)50 μ lを注入し、37°Cで15分間保温後に暗室中でホトンカウンター(浜松ホトニクス社)で発光量を測定した。

(6)ヒト3AR遺伝子の塩基多型検出
 上記(4)にて増幅し、(5)にて検出されたヒト3AR遺伝子の塩基多型検出結果を表2に示す。数値は発光量(cps: count/second)で表示される。T signal はTプローブと反応した増幅核酸断片の検出シグナルを、C signal はCプローブと反応した核酸断片の検出シグナルを示す。表2から分かるように各プローブで得られたシグナルの比の対数をとることにより37°C恒温反応において3AR遺伝子の1塩基多型が同定できる。すなわち、表2より明らかなように、RNase処理を行った場合、Tホモ、Cホモ、ヘテロ3タイプの同定が可能である。

【0051】

【表2】

サンプル名	T signal	C signal	Log(T/C)
Cホモ	380	1050	-0.44
Tホモ	3170	130	1.39
ヘテロ	5760	4620	0.10
N	140	80	0.24

30 【0052】

【発明の効果】上述したように、本発明の方法は、多型配列部分に特異的な2種以上のプローブを用いることにより、試料中に含まれる塩基多型を含む特定の核酸配列中に塩基多型の種類を容易に検出、同定できることを可能とするものである。

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA
 <120> A METHOD FOR DETECTING SNPs
 <130> 20C00JP
 <140>
 <141>
 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 1
ACGGCAGCGC CTTCTTG 17
<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 2
TTGCTGCGTG ACGTCGTG 18
<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 3
TTTTTCACCCA ATAGAAGCCA TGC 23
<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 4
TTTTTCACCCA ATGGAAGCCA TG 22
<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 5
CGCCAATAC CGCCAACAC 19
<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 6
ACGAACACGT TGGTCATGGT CT 22
<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

16

17

<400> 7

TTTTTGCCA TCGCCTGGAC TCCGAG

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

TTTTTGCCAT CGCCCGGACT CCGAG

18

22

25

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における本発明の方法により、ヒトA
DRB2遺伝子検出用特異的プローブのRNaseAに
よる分解検討結果を示す図である。

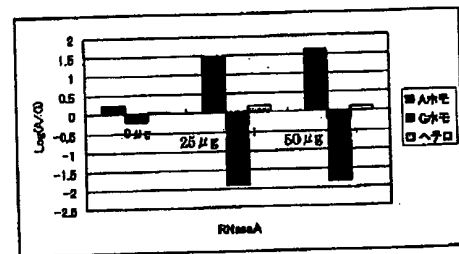
【図2】実施例2における本発明の方法により、 37℃で
ハイブリダイゼーションを実施し、 RNaseA処理を行った
場合のADRB2遺伝子の塩基多型検出の結果を示す図
である。

【図1】



レーン	サンプル
1	マーカー(φX174/Bae III TOYOBO)
2	Aプローブ: RNaseA処理
3	Aプローブ: アルカリ処理
4	Aプローブ: 処理なし
5	Gプローブ: RNaseA処理
6	Gプローブ: アルカリ処理
7	Gプローブ: 処理なし

【図2】



フロントページの続き

(72) 発明者 青野 利哉
滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 瀬川 昌也
滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

Fターム (参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA12
HA19
4B050 LL03
4B063 QA12 QA17 QQ42 QR08 QR14
QR42 QR55 QR62 QS25 QS34
QX02